

令和元年5月31日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07067

研究課題名(和文)慢性期虚血性白質障害における損傷メカニズムと細胞間の防御作用の検討

研究課題名(英文)The Effects of Astrocyte and Oligodendrocyte Lineage Cell Interaction on White Matter Injury under Chronic Cerebral Hypoperfusion

研究代表者

宮元 伸和 (Miyamoto, Nobukazu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10365661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性虚血性白質保護に関して重要であることは細胞間同士のinteractionであり，虚血下においてS100b陽性アストロサイトから放出されるBDNFが虚血下においてもオリゴデンドロサイト系の成熟に重要な役割を示していた．しかし障害を受けたアストロサイトはS100bが陰性となっており，栄養因子は放出していなかった．そのため，虚血性白質保護においてはアストロサイトの障害を軽減するのみでも保護できる可能性を示唆することができたと考えられる．これは治療方針の少ない，血管性認知症の治療としての起点になる可能性が示唆された．

研究成果の学術的意義や社会的意義

オリゴデンドロサイトの再生に関しては多発性硬化症研究の分野では報告があるものの，虚血性白質障害の分野における報告はいまだ数少ない．我々が考案した本研究は，脳虚血領域の中でも慢性期の病態に焦点を絞ることができ，さらにはいまだ有効な治療方法のない慢性期虚血性白質障害の治療に一石と投げられると考えられる．また，その役割機能を解明することは今日，社会的問題にもなっているアルツハイマー型認知症の克服にも発展的臨床応用が可能になると考える．BDNFを代表とするアストロサイトからの栄養因子強化は，白質保護につながるだけでなく，血管性認知症の治療ターゲットになる可能性が示された．

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of the interaction between astrocyte and oligodendrocyte lineage cells on myelination regarding the mechanism of impairment. White matter injury progressed in the BCAS model as myelin decreased. The numbers of OPCs and astrocytes increased after the operation, whereas that of OLGs decreased at day 28. BDNF continuously decreased until day 28. Differentiation was disrupted under the stressed conditions in the cell culture, but improved after administration of astrocyte-conditioned medium containing BDNF. Astrocytes with BDNF underwent differentiation, but differentiation was impaired under the stressed conditions due to the reduction of BDNF. We examined S100B regarding the mechanism of impairment. S100B is mainly expressed by mature astrocytes. GFAP-positive astrocytes increased in the corpus callosum in the BCAS model, whereas the number of mature astrocytes continued to decrease, resulting in reduced BDNF.

研究分野：神経内科学

キーワード：cell-cell interaction oligodendrogenesis

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界一の超長寿社会を迎えているわが国において、長期にわたる老年期をいかに健全に過ごすかが問われる世の中になっている。現代社会の大きな社会問題として、寝たきり介護者の増加が挙げられる。寝たきり状態となる原因疾患としては脳血管障害後遺症が約4割を占め、その中でも脳血管性認知症が重要な位置を占めている。ヒトの脳組織において軸索や髄鞘により構成される大脳白質の占める割合は大きく、脳梗塞の多くの臨床病型においても障害を受ける領域であり、またこの白質病変が認知症進展に関わっていると考えられている。従って白質を構成するアストロサイト、オリゴデンドロサイトの損傷を防御することは認知症への進展を防ぐという意味でも重要な治療ターゲットとなりうる。近年 Neuro-oligo-vascular niche という概念が盛んに提唱されており細胞間同士の保護効果が神経保護に重要であることが示されてきている。しかし、オリゴデンドロサイトーアストロサイト間に関してはいまだ不明な点がおおい。

2. 研究の目的

本研究では Brain derived neurotrophic factor (BDNF) の慢性脳虚血後の発現に注目し、慢性期虚血性白質障害におけるアストロサイト由来 BDNF の防御作用・修復効果を慢性脳虚血モデルで検討を行う。慢性脳虚血モデルは既報告において脳梗塞慢性期の病態の評価に適しているとされている(Farkas E et al. *Brain Res Rev* 54, 162-168, 2007)。アストロサイト由来の BDNF に関しては慢性脳虚血下において白質保護に重要な役割をしていることを先日、Miyamoto N, Maki T らにより報告した(*J Neurosci* 2015)。その報告の中で慢性低酸素負荷の系による細胞培養も用いた in vivo の実験においてアストロサイト由来 BDNF はオリゴデンドロサイトの髄鞘形成を促進することも報告されている。しかし、BDNF を up regulate した実験系はなく、その効果に関しての直接的証明・臨床的役割の解明はまだなされていない。そのため、今回は BDNF のアストロサイトでの発現亢進の実験もおこない、オリゴデンドロサイトへの分化、あるいは白質組織の再生能の有無もしくは白質保護効果の可能性を検討していく。さらに、慢性脳虚血モデルにおいてアストロサイト BDNF の発現亢進ができないかを検討していく。その裏付けとして慢性低酸素負荷の系による細胞培養も用いて in vivo のデータをおこなっていく。

われわれは既にマウス/ラット脳低灌流による慢性脳虚血モデルシステムを確立しており、慢性虚血による大脳白質障害の詳細を報告している。脳の慢性虚血により行動生理学的に学習記憶能力の低下が顕著に観察され、その原因として大脳白質におけるオリゴデンドロサイトの細胞死が強く関わっていることを明らかにしている (Watanabe T et al: *Stroke* 2006)。研究代表者は同モデルにおいてオリゴデンドロサイトの再生に関する検討も行い、ホスホジエステラーゼ 3 阻害薬(PDE3I)を経口投与することにより虚血性白質障害下においても白質障害の進展予防、オリゴデンドロサイトの再生が促されることを報告した (Miyamoto N et al: *J Cereb Blood Flow Metab* 2009)。さらにマウス脳低灌流モデルにおいて、虚血後 BDNF はアストロサイトに発現することが予備実験にて示されている。さらには加齢により BDNF の発現が低下することが予備実験にて示されている。

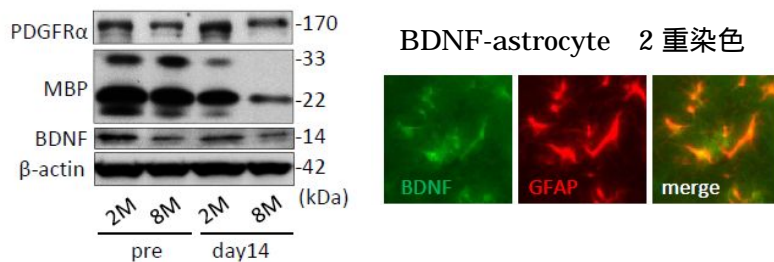


図1；虚血後 BDNF の発現は加齢マウス(8カ月齢)で低下し MBP の発現も加齢マウスで有意に低下する。虚血後 BDNF は GFAP (アストロサイトのマーカー) と共存している。

さらには、CoCl₂ を用いた慢性低酸素状態におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の成熟の実験もすでに行っており、慢性低酸素下においては成熟の抑制が起こる。(図2；PDGFRα；OPCのマーカー、MBP；成熟オリゴデンドロサイトのマーカー)これにアストロサイト培養溶液を加え培養するとオリゴデンドロサイト前駆細胞の成熟は回復することも予備実験で示されている(図3)。

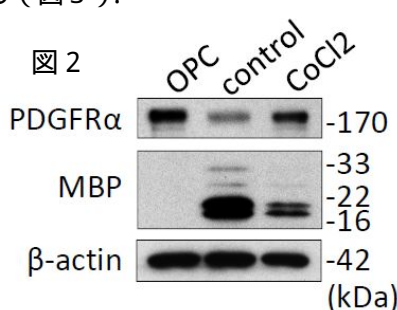
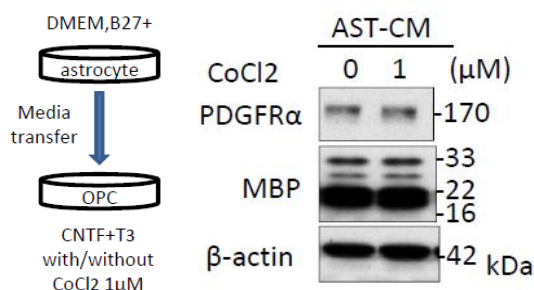


図3



以上の学術的背景から本研究は虚血性白質障害による認知機能障害の発症メカニズムに関してアストロサイト由来のBDNFによる、虚血性白質障害の進展抑制、再生の促進の可能性を検討することを目的とする。慢性白質病変に基づく認知症克服という大きなテーマに重点を置いている。これらは将来的な臨床治療への応用へとつながる非常に独創性の高い内容と思われる。

3. 研究の方法

慢性低灌流モデルの作成，新生細胞の評価。

雄性 10-12 週齢 C57BL6 マウスを用い，全身麻酔下に両側総頸動脈にマイクロコイルを挿入(沢根スプリング社製 コイル径 0.08mm×内腔 0.18mm×0.5mm 間隔×長さ 2.5mm)。慢性低灌流モデル (BCAS) を作成。同時にレーザー Doppler 法にて脳血流測定を施行し，脳血流を測定。手術前より 70% 以下に血流が低下している動物を使用した。手術前，手術後 7 日目，14 日目，28 日目に断頭し脳切片，もしくはウエスタンブロット用試料を作成。さらに新生細胞とその生存を評価するために，手術後 14 日目に BrdU 投与を行い標的細胞をラベリング。手術後 28 日で評価した。脳切片はクリオスタットにて，免疫組織化学染色用に 16 μ m，髄鞘評価用に 12 μ m にて切片を作成した。

初代細胞培養

オリゴデンドロサイト，アストロサイトの細胞培養は，新生児ラットの皮質から分離を行った。まずはグリア全体の培養を行い，細胞がコンフルエントになった状況で，マイクログリア，オリゴデンドロサイト前駆細胞，アストロサイトに分離。慢性低灌流を塩化コバルト 3 μ M にて再現し，7 日間の培養を行った後に各種染色，ウエスタンブロット法にて評価を行った。

アストロサイトメディウム (astrocyte conditioned medium; ACM) の作成

上記方法にてアストロサイト初代培養を作成。そのメディウムを収集し，遠心をかけ，内部の浮遊物を沈殿させ上清のみを使用した。同様に慢性虚血下培養として塩化コバルトを使用し培養し，これを障害アストロサイトメディウム (injured ACM; iACM) とした。これらをオリゴデンドロサイト培養に添加し，オリゴデンドロサイト前駆細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの分化率を評価した。

上記の結果を受け，BDNF 並びに，BDNF の受容体である TrkB 作動薬である 7,8-Dihydroxyflavone (78DHF) を，浸透圧ポンプを用い動物モデルに投与，培養細胞に添加を行い，効果を評価した。評価は，Y-maze による見当識障害評価，免疫組織学におこなった。

CRE-FLOX 系のモデルを用いた BDNF 発現強化アストロサイトを持つマウスの作成

GFAP-Cre transgenic mice と Bdnf^{tm3Jae/J} を交配することにより，アストロサイトに BDNF の発現強化させたマウスを作成。行動学実験にて慢性虚血下においても，認知機能を保てるかを評価した。

4. 研究成果

慢性虚血モデルの確認，BDNF の発現

BCAS 後徐々に白質障害は進行していき，ミエリンの量 (フルオロミエリン染色，ミエリン塩基性蛋白; MBP) としては手術前を 100% とすると手術後 28 日で 50% まで低下した。このなかで，オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC)，成熟オリゴデンドロサイト (OLG)，アストロサイト (AST) の変化を確認すると，OPC は手術後徐々に上昇，OLG は手術後 14 日をピークに増加，手術後 28 日では逆に低下している状況となった。AST は徐々に増加していくことが確認できた。MBP と OPC，OLG の発現状況に差異が認められたため，新生細胞を Ki67 染色 (細胞分裂のマーカー)，新生細胞の成熟，生存を確認するため，BrdU を手術後 14 日で投与。28 日で評価を行った。その結果，OPC は成熟できず，生存できないため白質障害が進行していくことが判明した。

慢性虚血下での BDNF の発現量，その動態

この状況での BDNF の発現を確認したところ，BCAS 手術後徐々に低下。そのシグナル伝達系の活性型 CREB も徐々に低下することが判明した。BDNF の発現する細胞を確認したところ，手術前は AST が 60% 程度，オリゴデンドロサイト系細胞が 30%，血管内皮が 10% 程度であったものが，手術後オリゴデンドロサイト系の発現が低下。最終的には AST が 90%，血管内皮が 10% の状況となった。BDNF の受容体である TrkB は OPC，OLG に発現していた。また AST とオリゴデンドロサイトは組織上で近傍に存在していることも確認した。BDNF の発現量が低下しており，徐々に低下することから，AST 内での BDNF 発現細胞の割合を確認したところ術後徐々に低下していくことが判明した。

BDNF を発現している AST の性質

次に BDNF を発現している AST の性質を確認した。AST の中には反応性 AST，成熟 AST と

いうものがあり、S100 陽性 GFAP が成熟 AST といわれている。成熟 AST は栄養因子を周辺の細胞（神経細胞、血管内皮細胞、オリゴデンドロサイト系細胞）に与えていることが知られており、BCAS 下での動きを確認した。その結果 S100 +AST は手術後徐々に数は減少していきことが判明した。さらには S100 +AST と BDNF の発現は共存していた。この結果から、**慢性虚血下においては、成熟 AST が減少することで栄養因子等が減少。そのためオリゴデンドロサイト系の細胞が成熟できず、白質障害が進む可能性が考えられた。**

これらの実験は in vivo の系であり様々な因子が関与している可能性が高く、そのためその答えを in vitro に求めた。

ラット初代培養系でのオリゴデンドロサイト成熟に対する BDNF、ACM の効果

塩化コバルトを用いた細胞培養系での培養にて慢性虚血モデルの状況を再現し OPC から OLG への成熟を確認した。塩化コバルトを用いることで、OPC から OLG への成熟が阻害されることが確認でき、この効果は ACM 投与により OLG への成熟が塩化コバルト投与下でも保たれていた。この効果は BDNF のシグナル伝達系である Akt CREB という経路を阻害することでキャンセルされた。また、慢性虚血負荷をかけたのちの iACM においてはこの効果は乏しいことが判明した。そのため ACM iACM 内の BDNF 含有量を確認したところ iACM では BDNF の含有量は低下していた。その確認のため同様に BDNF 投与でも実験を行ったところ同様の結果を得られた。この結果から**慢性虚血下においても ACM 内での BDNF があることにより、オリゴデンドロサイト系の成熟を促進できるものと考えられた。**

BCAS モデルに対する BDNF、TrkB 作動薬の投与

このことからまずは BDNF を浸透圧ポンプにて手術後に投与する方法を試みたが、BDNF の活性が室温等により失活してしまうことが判明し、白質保護効果が得られなかった。そのためその受容体作動薬である 78DHF を投与することとした。培養系においては 78DHF 投与により OPC から OLG への成熟が確認できた。そのため、浸透圧ポンプにて投与を試みたところ、白質保護効果としてはあるものの、十分ではなく、Y-maze による見当識障害評価においても有意な差を認めることができなかった。これは TrkB は全長型のものであれば、神経保護効果を占めるような経路に働くが、その他ものにおいてはむしろ、炎症細胞等を動員してしまう増悪因子となることに関与しているものと推察された。

CRE-FLOX 系のモデルを用いた BDNF 発現強化アストロサイトを持つマウスの作成

そのため、CRE-FLOX 系を用い、BDNF 発現強化アストロサイトを持つマウスの作成することで最終確認する方針とした。しかし、胎生致死の状況に陥り進展が困難であった。この要因としては BDNF が発生段階で器官形成に深くかかわっており、また BDNF は腫瘍細胞等にも今日発現していることが要因として考えられた。今後この答えを、抗体標的を行ったりボゾーマル製剤の投与をしていくことで確認していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Magami S, Miyamoto N, Ueno Y, Hira K, Tanaka R, Yamashiro K, Oishi H, Arai H, Urabe T, Hattori N. The effects of astrocyte and oligodendrocyte lineage cell interaction on white matter injury under chronic cerebral hypoperfusion. Neuroscience. 2019 May 15;406:167-175 査読あり

〔学会発表〕(計4件)

宮元伸和, Ji Hae Seo, 眞木崇州, Eng H. Lo, 荒井健, 卜部貴夫. オリゴデンドロサイト前駆細胞と脳白質障害極初期の血液脳関門破綻と関連性 第41回日本脳卒中学会 札幌 2016年4月14~16日

宮元伸和, 眞木崇州, Ji Hae Seo, 田中亮太, Irwin H. Gelman, Eng H. Lo, 荒井健, 卜部貴夫, 服部信孝. オリゴデンドロサイト新生子に対する AKAP12 の重要性 第42回 日本脳卒中学会 大阪 2017年3月16-19日

宮元伸和, Loc Pham, 眞木崇州, 田中亮太, 卜部貴夫, Eng H. Lo and 荒井健 服部信孝. マウス慢性脳虚血モデル初期の BBB 破綻に対する酸化ストレス抑制効果の検討. 第60回日本脳循環代謝学会 2017年11月3-4日 大阪

眞上俊亮, 宮元伸和, 大石英則, 服部信孝, 新井一. 慢性脳虚血による脳白質障害と Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)の白質保護作用について 第43回日本脳卒中学会学術集会 2018年3月15日-18日 福岡

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。